

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-165679

(43)公開日 平成6年(1994)6月14日

(51)Int.Cl ⁵ C 12 N 15/12 1/21 5/10	識別記号 ZNA	序内整理番号 7236-4B	F I	技術表示箇所
		8931-4B 9281-4B	C 12 N 15/ 00 5/ 00	A B
審査請求 未請求 請求項の数10(全 14 頁) 最終頁に続く				

(21)出願番号 特願平4-322918

(22)出願日 平成4年(1992)12月2日

特許法第30条第1項適用申請有り 平成4年11月20日、
日本分子生物学会発行の「第15回 日本分子生物学会年
会プログラム・講演要旨集」に発表

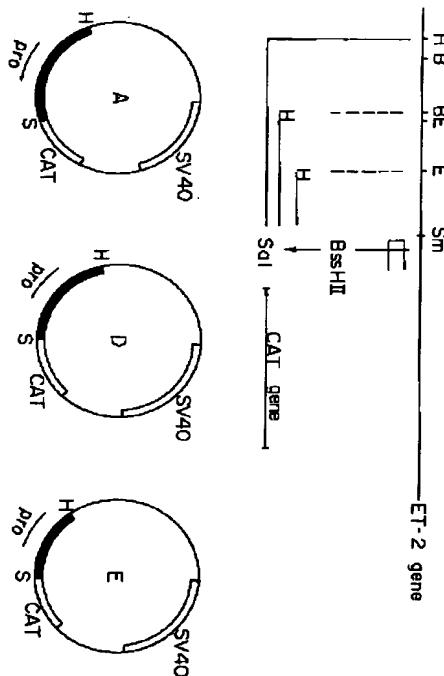
(71)出願人 000002934
武田薬品工業株式会社
大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号
(72)発明者 音田 治夫
茨城県土浦市下高津4丁目5番26号
(72)発明者 木村 千春
茨城県つくば市花畑3丁目9番7号 関マ
ンション204号
(72)発明者 大久保 尚一
茨城県つくば市竹園2丁目14番地の13 エ
ザンス竹園203号
(74)代理人 弁理士 岩田 弘 (外5名)

(54)【発明の名称】ヒト・エンドセリン-2遺伝子のプロモーター活性を有する領域を含有するDNA

(57)【要約】

【構成】ヒト・エンドセリン-2遺伝子の5'上流域か
らプロモーター活性を有する約3Kbの領域をクローニ
ングした。該領域から制限酵素による切断、Bam 131
処理等によって、更に短いDNA断片群を単離し、その
転写活性を調べたところ、転写開始点から上流45塩基
までの領域を含有するDNA断片がプロモーターとして
機能することを見いだした。

【効果】上記ヒト・エンドセリン-2のプロモーター
は、SV40由来のプロモーターなど公知のものと比較
して強力であり、動物細胞用のプロモーターとして極め
て有用である。



【特許請求の範囲】

【請求項1】ヒト・エンドセリン-2遺伝子のプロモーター活性を有する領域を含有するDNA。

【請求項2】配列番号2の塩基配列を有するDNAを含有する請求項1記載のDNA。

【請求項3】配列番号3の塩基配列を有するDNAを含有する請求項1記載のDNA。

【請求項4】ヒトゲノムDNA由来の請求項1記載のDNA。

【請求項5】ヒトゲノムDNAが配列番号1の塩基配列を有するDNAである請求項4記載のDNA。

【請求項6】請求項1記載のDNAを含有するベクタ

。

【請求項7】請求項6記載のベクターを保持する形質転換体。

【請求項8】細菌である請求項7記載の形質転換体。

【請求項9】動物細胞である請求項7記載の形質転換体。

【請求項10】請求項7記載の形質転換体を培養し、プロモーター活性を有するDNAの下流に接続した蛋白質またはペプチドをコードする構造遺伝子を発現させることを特徴とする該蛋白質またはペプチドの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、ヒト血管収縮ペプチドであるヒト・エンドセリン-2遺伝子のプロモーター活性を有する領域をコードするDNAを含有するDNA、該DNAを含有するベクター、該ベクターを含有する形質転換体、及び該形質転換体を培養しプロモーター活性を有するDNAの下流に接続した蛋白質またはペプチドをコードする構造遺伝子を発現させることを特徴とする蛋白質またはペプチドの製造方法に関する。本明細書においてプロモーターとは、RNAポリメラーゼが結合し、RNAの転写の開始のシグナルとなるDNAの領域を指す。

【0002】

【従来の技術】内皮依存性の血管拡張反応と並んで、種々の刺激に対する内皮依存性の血管収縮反応が報告されている。血管の伸張や内圧の亢進といった機械的負荷による収縮、トロンビンによる収縮、血中酸素の減少による収縮、さらにはニューロペプチドY [Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 79, 5485 (1982); 同, 81, 4577 (1984)]によるノルアドレナリン収縮の増強などがその例である。アメリカン・ジャーナル・オブ・フィジオロジー (Amer. J. Physiol.) , 248, c550 (1985) 及びジャーナル・オブ・セル・フィジオロジー (J. Cell. Physiol.) , 132, 263 (1982) には、内皮細胞由来の冠血管収縮因子 (分子量はそれぞれ 8500, 3000) が記載されているが構造は不明である。また、ジャーナル・オブ・ファーマコロジー・アンド・エクスペリメンタル・セラピューティクス (J. Ph

armac. Exp. Ther.) , 236, 339 (1985) にも内皮細胞由来のペプチド様物質が記載されているが、これも構造は不明である。

【0003】また、血管収縮作用を有するペプチドとしてパソプレッシン (Vasopressin) が知られておりそのアミノ酸配列も明らかにされているが、パソプレッシンが哺乳類または鳥類の血管内皮細胞を起源として単離されたという報告はない。更に、血管収縮作用を有するアンジオテンシン (Angiotensin) がウシ大動脈の内皮細胞から得られたという報告 [Circulation Research, 60, 422 (1987)] があるが、アンジオテンシンは分子量約 100 のペプチドである。

【0004】本発明者らの一部は、血管収縮作用を有するペプチドとして、先にブタ大動脈内皮細胞よりブタ・エンドセリンを単離することに成功し (特開平1-206997)、また本発明者らの一部は、ヒト・エンドセリンの単離、ブタ・エンドセリン及びヒト・エンドセリンのcDNAのクローニングにも成功している (特開平2-72877)。このブタ及びヒトのエンドセリンの成熟ポリペプチドのアミノ酸配列は同一で、これをエンドセリン-1と呼ぶ。また、本出願人は、ラット・エンドセリンの単離、cDNAのクローニングに関しても出願を行っており (特開平2-27983)、これをエンドセリン-3と呼ぶ。

【0005】更に、本出願人は、マウス・エンドセリンの単離、cDNAのクローニングに関しても出願を行っており (特開平2-76583)、これをエンドセリンBと呼ぶ。更に、本出願人は、エンドセリン-1の一部をコードする合成DNAをプローブとして使用して、ヒトゲノムDNAライブラリーからエンドセリン-1とは異なるアミノ酸配列を有するエンドセリンをコードするDNAをクローニングした (特開平2-27983)。本発明者らはこのエンドセリンをエンドセリン-2と命名した。エンドセリン-2は主に腎臓と小腸で生産されており、平滑筋収縮作用などの作用を有することが明らかになっている。ここでエンドセリンとは、分子量 2500 ± 300 でアミノ酸 21 個からなる血管収縮作用を有するペプチドの総称であり、そのアミノ酸のN末端から数えて第1番目、第3番目、第11番目、第15番目に位置する4個のシステインが2組のジスルフィド結合を形成している構造を有するものである。このジスルフィド結合の組合せとしては、1-15、3-11の組合せ、及び1-11、3-15の組合せがあるが、前者の組合せを有するものの方が生成比が高く、また活性も大きい。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】上記エンドセリンのうち、ヒト・エンドセリン-2の発現機序、特にヒト・エンドセリン-2遺伝子のプロモーターについてはいまだ未知であり、プロモーター活性を有する最小の領域、プ

ロモーター活性の強さなどは解明されていない。本発明は、ヒト・エンドセリン-2遺伝子のプロモーター領域を含むDNAをクローニングし、プロモーター活性を有する最小の領域、プロモーター活性の強さなどを解明し、遺伝子組換え技術を用いた蛋白質またはペプチドの生産に役立てることを目的とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、エンドセリン-1のゲノムDNAの一部をコードする合成DNAからなるDNAをプローブとして使用して、ヒトゲノムDNAライブラリーからヒト・エンドセリン-2遺伝子を単離した。そして、ヒト・エンドセリン-2遺伝子の様々な長さの5'末端領域のDNA断片をクローニングし、該断片をクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、ルシフェラーゼなどの構造遺伝子の上流に接続して、該DNA断片のプロモーター活性を確認した。そして、プロモーター活性を有するのに必要なDNA領域を決定し、この領域を含有するDNAを、遺伝子組換え技術を利用した蛋白質またはペプチドの大量生産に供することに成功した。

【0008】本発明のヒト・エンドセリン-2遺伝子のプロモーターは、配列番号1または図2に示される塩基配列を含有するものであるか或はその一部であり、公知のものとは異なる新規なものである。本発明におけるヒト・エンドセリン-2遺伝子のプロモーターを含有する発現ベクターは、例えば(i)ヒト細胞からゲノムDNAを分離し、このDNAをファージまたはプラスミドに組み込み、(ii)得られた組み換えファージまたはプラスミドで宿主を形質転換し、(iii)得られた形質転換体を培養後、形質転換体から適当な方法(例えばヒト・エンドセリン-2の一部をコードするDNAプローブとのハイブリタリゼーション)により、目的とするDNAを含有するファージあるいはプラスミドを単離し、(iv)その組み換えDNAから目的とするDNAを切り出し、(v)該DNAまたはその一部を公知の動物細胞用の発現ベクター中のプロモーター領域と置換することにより製造することができる。

【0009】ヒト細胞からゲノムDNAを調製する方法としては、例えばマニアティス(T. Maniatis)らの方法[Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory(1982), p. 280-285]などが挙げられる。このようにして得られたゲノムDNAをコリンス(J. Collins)とホーン(B. Hohn)の方法[Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 71, 2442(1978)]に従いファージまたはプラスミドに組み込む。DNAを組み込むファージベクターとしては、例えば入g t 1 1(Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 80, 1194(1983))などが挙げられるが、その他のものであっても、宿主内で複製増殖されるものであれば用いることができる。ファージベクターにDNAを組み込む方法としては、例えばヒューン(Hyunh T. V.)の方法(DNA Cloni-

ng, A Practical Approach, 1, 49(1985)]などが挙げられる。

【0010】DNAを組み込むプラスミドとしては、例えば大腸菌由来のpBR322[Gene, 2, 95(1977)]、pBR325[Gene, 4, 121(1978)]、pUC12[Gene, 19, 259(1982)]、pUC13[Gene, 19, 259(1982)]、枯草菌由来のpUB110[Biochemical and Biophysical Research Communication, 112, 678(1983)]などが挙げられるが、その他のものであっても、宿主内で複製増殖されるものであればいずれをも用いることができる。プラスミドにDNAを組み込む方法としては、メソゾ・イン・モレキュラー・バイオロジーに記載の方法[Methods in Molecular Biology, Elsevier(1986), p222-226]などが挙げられる。このようにして得られたファージベクターまたはプラスミドは、適当な宿主例えはエシェリキア(Escherichia)属菌などに導入する。

【0011】上記エシェリキア属菌の例としては、エシェリキア・コリ(Escherichia coli)の菌株K12DH1[Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 60, 160(1968)]、M103[Nucleic Acids Research, 9, 309(1981)]、J A221[Journal of Molecular Biology, 120, 517(1978)]、HB101[Journal of Molecular Biology, 41, 459(1969)]、C600[Genetics, 39, 440(1954)]などが挙げられる。ファージベクターで宿主を形質転換する方法としては、例えばインビトロパッケージング法[Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory(1982), p. 256-268]などが挙げられる。

【0012】またプラスミドで宿主を形質転換する方法としては、例えばマニアティス(T. Maniatis)らのカルシウムクロライド法あるいはカルシウムクロライド/ルビジウムクロライド法[Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory(1982), p. 249-255]などが挙げられる。またヒト・エンドセリン-2遺伝子を含有するヒトゲノムDNAライブラリーは上記の方法などで得ることができるが、市販品として購入することも可能であり、例えばクローンテクノロジーズ社(Clonetech Laboratories Inc., 米国)から入手することができる。

【0013】ヒトゲノムDNAライブラリーからヒト・エンドセリン-2遺伝子をクローニングする方法としては、例えば、ファージベクターEMBL3にヒトゲノムDNA断片を挿入したDNAライブラリーから、ヒト・エンドセリン-2のアミノ酸配列に基づいて化学合成したオリゴヌクレオチドをプローブとして使用するプラクハイブリダイゼーション法[Molecular Cloning Cold Spring Harbor Laboratory(1982), p. 320-328]によって単離する方法などが挙げられる。このようにしてクローニングされたヒト・エンドセリン-2遺伝子は必要があればプラスミド、例えばpBR322、pUC12、pUC13、pUC18、pUC19、pUC118、pUC119などにサブクローニングすることができる。

このようにして得られたDNAの塩基配列を、例えばマキサム・ギルバート(Maxam-Gilbert)法[Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 74, 560(1977)]あるいはジデオキシン法[Nucleic Acids Research, 9, 309(1981)]によって決定し、既知のアミノ酸配列との比較からヒト・エンドセリン-2遺伝子の存在を確認する。以上のようにして、ヒト・エンドセリン-2の遺伝子が得られる。

【0014】後述の実施例2で得られたヒト・エンドセリン-2の遺伝子断片の制限酵素地図を図1に示す。またジデオキシン法で決定したDNAの塩基配列を図2ないし図4に示す。以上のようにしてクローニングされたヒト・エンドセリン-2遺伝子は目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化して使用することができる。クローニングされたDNAからプロモーターとして使用する領域を切り出し、発現に適したベクター中のプロモーターと置換し、更に該エンドセリン-2由来のプロモーターを含むDNA断片の下流に発現させたい構造遺伝子を連結して、発現ベクターを得ることができる。発現ベクターを作成する際の原料となるベクターとしてはレトロウイルス、ワクシニアウイルスなどの動物ウイルスなどが挙げられる。

【0015】動物ウイルス由来の発現ベクターにおいてSV-40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーターなどの代わりに、このヒト・エンドセリン-2遺伝子のプロモーターを使用することができる。このようにして構築されたヒト・エンドセリン-2遺伝子プロモーターを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造する。宿主としては、例えばエシェリキア属菌、動物細胞などが挙げられる。上記エシェリキア属菌としては、前記したものと同様のものが挙げられる。

【0016】動物細胞としては、例えばサル細胞COS-7、Vero、チャイニーズハムスター細胞CHO、マウスL細胞、ヒトFL細胞などが挙げられる。上記エシェリキア属菌の形質転換は、例えばプロシージング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス[Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 69, 2110(1972)]やジーン[Gene, 17, 107(1982)]に記載の方法に従って行うことができる。動物細胞の形質転換は、例えばヴィロロジー[Virology, 52, 456(1973)]に記載の方法によって行うことができる。このようにして、ヒト・エンドセリン-2遺伝子のプロモーターを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体が得られる。

【0017】宿主がエシェリキア属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生成に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えばグルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、例えばアンモニアウム塩類、硝酸塩類、コーンスチーブ・リカー、ペプト

ン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、パレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としては例えば塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母抽出物、ビタミン類、成長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5.8が望ましい。

【0018】宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば5~20%の牛胎児血清を含むMEM培地[Science, 122, 501(1952)]、DMEM培地[Virology, 8, 396(1959)]、RPMI 1640培地[The Journal of the American Medical Association, 199, 519(1967)]、199培地[Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, 1(1950)]などが挙げられる。pHは約6.8であるのが好ましい。培養は、通常約30~40°Cで約15~60時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。上記培養物から、ヒト・エンドセリン-2遺伝子のプロモーターの下流に結合した構造遺伝子から発現した生成物を分離精製するには、例えば下記の方法により行うことができる。

【0019】発現された蛋白質またはペプチドを培養菌体あるいは細胞から抽出する際には、培養後公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチーム及び/または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過により蛋白質またはペプチドの粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどの蛋白質変性剤や、トリトンX-100などの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中に蛋白質や成熟ペプチドが分泌される場合には、培養終了後、それ自体公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集めること。

【0020】このようにして得られた培養上清あるいは抽出液中に含まれる蛋白質や成熟ペプチドは、公知の分離、精製法を適切に組み合わせて精製、分離することができる。これらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法限外ろ過法、ゲルろ過法、及びSDS-ポリアクリラミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティーコロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが挙げられる。

【0021】このようにして得られたヒト・エンドセリン-2遺伝子のプロモーター下流に結合した構造遺伝子がコードする蛋白質またはペプチドは、エンザイムイムノアッセイなどにより測定することができる。また生成物が生理活性を有する場合は、該活性を指標にして測定することができる。本明細書及び図面において、塩基な

どを略号で記載する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclatureによる略号あるいは当該分野における慣用記号に基づくものであり、その例を以下に挙げる。

【0022】DNA：デオキシリボ核酸
cDNA：相補的デオキシリボ核酸

RNA：リボ核酸

mRNA：メッセンジャーRNA

A：アデニン

T：チミン

G：グアニン

C：シトシン

なお、本発明のヒト・エンドセリン-2のプロモーターDNAにおいては、その塩基配列の一部が修飾（付加、除去、その他の塩基の置換など）されていてもよい。

【0023】

【実施例】以下の実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。なお、実施例3で得られた形質転換体エシェリキア・コリ (Escherichia Coli) DH10B/pHGET2は、平成4年1月26日から通商産業省微生物工業技術研究所 (FRI) に受託番号FERM-BP-4083として寄託されている。

【0024】実施例1 ヒト・エンドセリン-2の遺伝子の一部をコードするDNAプローブの作成

ヒト・エンドセリン-2のcDNAの5'末端側の配列である、配列番号4の塩基配列のDNAを化学合成し、T4ポリヌクレオチデキナーゼを用いて常法に従って [Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory (1982), p.122-127に記載] DNAの5'末端を32Pでラベルし、ヒト・ゲノムDNAライプラリーのスクリーニングに用いた。

【0025】実施例2 ヒト・エンドセリン-2遺伝子の単離とその塩基配列の決定

大腸菌Y1090にヒト白血球由来のゲノムDNAライプラリー (Clontech Laboratories Inc.製) を感染させてブレーティングし、ファージブラークを出現させた。ベントンとデービス (benton W., Davis R.) の方法 [Science, 196, 180 (1977)] に従って、ブラークを形成したファージDNAの一部をナイロン膜にレプリカし、32Pで標識した実施例1記載のDNAプローブとブラークハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションは20%ホルムアミドの存在下42°Cで行い、該膜は2×SSC、0.1%SDS中で40°Cで洗浄した。プローブとハイブリダイズしたクローンを単離し、そのうちの1クローンからヒトゲノムDNAインサートを制限酵素 Hind IIIで切り出して、プラスミドpUC118にサブクローニングし、pHGEH1を得た。このプラスミドで大腸菌DH5αを形質転換し、形質転換体エシェリキア・コリ (Escherichia Coli) DH5α/pH

GEH1を得た。

【0026】このプラスミドに含有されるヒト・エンドセリン-2遺伝子の制限酵素地図を図1に示す。図中の□の区域は、ヒト・エンドセリン-2成熟体の一部のコード領域を示す。また、図1中、HはHind III、PはPst I、BはBamHI、EはEcoRI、Sma IはSma I、Sac IはSac I、Sph IはSph I、Acc IはAcc I、Hinc IIはHinc IIの切断部位を表す。また、この成熟体のコード領域とその周辺の塩基配列をサンガー (Sanger) の方法 [Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 74, 5463 (1977)] によって決定した。この塩基配列の一部を図2ないし図4 (配列番号1) 及び図5ないし図6に示す。図5ないし図6中、矢印の起点 (G) は転写開始点を、TATAboxで示した□の区域は真核細胞のプロモーターのコンセンサス配列であるTATAボックスを、負の数字は転写開始点からの距離を示す。

【0027】実施例3 ヒト・エンドセリン-2遺伝子のプロモーター領域の決定 (1)

(i) 実施例2においてプラスミドpHGEH1にサブクローニングされたヒト・エンドセリン-2の遺伝子の塩基配列 (ii) ヒト・エンドセリン-2をコードするcDNAの塩基配列 (特開平3-143127に記載) を比較して、プラスミドpHGEH1にサブクローニングしたヒト・エンドセリン-2の遺伝子の塩基配列中に、ヒト・エンドセリン-2の前駆体のエクソンが存在することを確認し、ヒト・エンドセリン-2遺伝子の5'上流領域の3'末端側の境界 (エクソンIの5'末端に相当) を決定した。

【0028】図1に示すように、プラスミドpHGEH1にサブクローニングされたヒト・エンドセリン-2遺伝子の5'上流には制限酵素Hind III、BamHI、EcoRI切断部位が存在する。pHGEH1をBamHIまたはEcoRIで部分分解したのち、大腸菌DNAポリメラーゼI処理により粘着末端 (staggered-end) を平滑末端 (blunt-end) に変換した [Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory (1982), p.113-14 記載の方法による]。その後、形成した平滑末端にT4DNAリガーゼによりHind IIIリンクを接続した。引き続きBss Iで更にDNA切断を行った後 (Bss I切断部位はヒト・エンドセリン-2のエクソンIのすぐ下流に存在する)、同様の方法でBss I切断部位を平滑末端化し、Sal Iリンクを接続した。これらの操作により、5'末端にHind III切断部位、3'末端にSal I切断部位を有し、異なる長さのヒト・エンドセリン-2遺伝子の5'上流領域のDNAからなる3種類のDNA断片が得られた (それぞれ約3Kb、2Kb、1Kb)。

【0029】この3種のDNA断片を、クロラムフェニールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) をコードするDNAを含有するプラスミドpCAT-basic

(Promega社) のCAT遺伝子の直上流に位置するマルチクローニング部位内のHind III切断部位とSal I切断部位との間に挿入し、3種のプラスミド(それぞれA、D、E)を得た(図7)。このプラスミドAは、形質転換体エシェリキア・コリ(Escherichia Coli) DH10B/pGET2(FERM BP-4083)に保持されている。図7中、HはHind III、BはBamHI、EはEcoRI、SmはSmaI、Sal IはSal Iの切断部位を表す。また、■で示される領域はヒト・エンドセリン-2遺伝子の5'上游領域のDNAを、CATと記された□で示される領域はクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼをコードするDNAを、SV40と記された□で示される領域はSV40の複製開始点を含むDNAをそれぞれ表す。プラスミドAは約3Kbのインサートを、プラスミドDは約2Kbのインサートを、プラスミドEは約1Kbのインサートを有している。なおこのプラスミドAは、形質転換体エシェリキア・コリ(Escherichia Coli) DH10B/pHGET2(FERM BP-4083)に保持されている。

【0030】これらのプラスミドを精製した後[Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory(1982), p88-96記載の方法による]、これらのプラスミドを、6cmシャーレ(Falcon社製)中で培養したヒト腎臓細胞ACHN(ATCC CRL 1611)に磷酸カルシウム法[Methods in Molecular Biology, Elsevier(1986) p.286-289]により導入した。形質転換から48時間後に細胞を回収し、CATアッセイを行った[Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 83, 1598(1986)記載の方法による]。

【0031】図8に示すオートラジオグラムは、プラスミドA、プラスミドD、プラスミドEで形質転換した細胞はいずれもクロラムフェニコールを産生したことを示している。即ち、ヒト・エンドセリン-2遺伝子から単離された上記3種類のDNA断片はいずれもプロモーター活性を有することが判明した。なお、図5中、A、D、EはそれぞれプラスミドA、プラスミドD、プラスミドEで形質転換した細胞に対するCATアッセイのレーンを、BはネガティブコントロールとしてのプラスミドBで形質転換した細胞に対するCATアッセイのレーンを、CはポジティブコントロールとしてのプラスミドCで形質転換した細胞に対するCATアッセイのレーンを示す。

【0032】実施例4 ヒト・エンドセリン-2遺伝子のプロモーター領域の決定(2)

実施例3で得られたプロモーター活性を有するDNA断片のうち、プラスミドEにクローニングされた最も短い約1Kbの断片について、プロモーター活性を有する領域をさらに限定するために、該断片に含まれるより短いDNA断片がプロモーター活性を有するかどうかを検討した。実施例3で使用したクロラムフェニコールアセチ

ルトランスフェラーゼ(CAT)をコードするDNAに代えて、ホタル・ルシフェラーゼをコードするDNAをプロモーター活性を測定するDNA断片の下流に接続したプラスミドを構築した。構築方法は以下の通りである。

【0033】プラスミドEをHind IIIで切断し、切断されたDNAに対してエキソヌクレアーゼBam 131を用いて5'末端側からDNAの消化を行った[Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory(1982), p. 135-139記載の方法による]。T4 DNAポリメラーゼを用いてDNAの末端を平滑化した後、Sac I リンカーを接続した。その後Sal I(Sal I切断部位は、ヒト・エンドセリン-2のエクソンIのすぐ下流に存在する)でDNAを切断し、T4 DNAポリメラーゼを用いてDNAの末端を平滑化した後、Bgl IIのリンカーを接続した。これらの操作により、5'末端にSac I 切断部位、3'末端にBgl II 切断部位を有し、プラスミドEにクローニングされた約1Kbのヒト・エンドセリン-2遺伝子の5'上游領域のDNAの一部分からなる、様々な長さのDNA断片が得られた。

【0034】これらのDNA断片をルシフェラーゼ発現ベクターpGVのSac I-Bgl II部位に組み込み、pGV(-1173/+69LUC)、pGV(-658/+69LUC)、pGV(-355/+69LUC)を構築した(図9)。図9中、lucはホタル・ルシフェラーゼをコードするDNAを示す。上記断片よりさらに大きく5'領域を欠損したDNA断片はPCR法を利用して合成した。DNAの5'末端にMlu I認識配列、3'末端にBgl II認識配列が存在するように合成を行った。合成した種々の長さのDNA断片をpGVのMlu I-Bgl II部位に組み込み、pGV(-201/+69LUC)、pGV(-147/+69LUC)、pGV(-117/+69LUC)、pGV(-45/+69LUC)、pGV(-25/+69LUC)、pGV(+1/+69LUC)を構築した(図9)。

【0035】これらのプラスミドを精製した後[Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory(1982), p88-96記載の方法による]、これらのプラスミドを、6cmシャーレ(Falcon社製)中で培養したヒト腎臓細胞ACHNに磷酸カルシウム法[Methods in Molecular Biology, Elsevier(1986) p.286-289]により導入した。その後、発現されたルシフェラーゼ活性を測定した[Mol. Cell. Biol., 1, 725(1987)記載の方法による]。その結果、ヒト・エンドセリン-2の遺伝子の転写開始部位から上流45塩基までの領域を有するDNA断片をルシフェラーゼ遺伝子の上流に結合したpGV(-45/+69LUC)もルシフェラーゼ遺伝子を発現することが判明した(図10)。即ち、ヒト・エンドセリン-2の遺伝子の転写開始部位から上流45塩基までの領域が、プロモー

ター活性を有する最小単位であることが示された。

【0036】更に、ヒト・エンドセリン-2の遺伝子の転写開始部位から上流1173塩基までの領域を有するDNA断片をルシフェラーゼ遺伝子の上流に結合したpGV (-1173/+69LUC)は、SV40のプロモーターの下流にルシフェラーゼ構造遺伝子を結合したプラスミドpGV-Pに比べて約4倍の発現量を示しており(図10)、該領域を有するDNA断片は、動物細胞用プロモーターとして非常に有用であることが判明した。なお、上記pGV (-1173/+69LUC)は、ヒト腎臓由来のACNH細胞のみならずサル腎臓由来のCOS7細胞中でも発現が認められ、ヒト・エンドセリン-2の遺伝子のプロモーターは、動物細胞の腎臓由来の細胞で広く活性を有することが判明した。

【0037】

【発明の効果】本発明のヒト・エンドセリン-2遺伝子のプロモーターと製造したい蛋白質またはペプチドをコードする構造遺伝子とを結合した発現ベクターによって形質転換された細胞は、大量の目的とする蛋白質またはペプチドを产生するので、目的とする蛋白質またはペプチドの生産を効率よく行うことができる。また、ここに製造されるヒト・エンドセリン-2遺伝子のプロモーターを含有するベクターは、他の遺伝子のプロモーター(例えばヒト・エンドセリン-1遺伝子のプロモーター、ヒト・エンドセリン-3遺伝子のプロモーター)と

配列：

AACCTTCCTG	GTCCAGGGCC	TCGATTGCAA	TCCCAGGCAC	CTGCTGCAGC	CCAGCCCTGT	60
TGTGTCAGGC	ATCACTAGGA	GACTTAGTCT	TCACTCCCAT	GCAACCTCCA	TTCAGCTCAG	120
TCTCCACAGC	TGCTGGACAG	CTGTTGACG	GGACCATATT	TGCTTTAGA	GCTGGGACTA	180
TAGAGGGAGC	TTTGGGGTGC	ACAGAGAGAC	ACCTTAACCT	CATCCCAATG	CCCCACCCCTT	240
CCTCCCACTG	GGGTCCCTTC	TGACGGCCTT	TCTCCAAGGG	ACCCAGGATC	CTGGGCTCAG	300
TTTGGACCCC	TGGGAGAGCT	TCACGGGTCT	ACAGGAAAGG	GTGAGGCAGG	TTAGGAACCA	360
AGAGAACACA	CCCAGCCCCA	TCAGTGTCTT	GAGCCAGTTG	CTCCTCCTCT	TGCACCTCAG	420
TTATCTCATC	TACCAAATGG	GACTGGAGAC	GGGGATTTCT	AGGGGAAAGT	TTCTACCCCCA	480
GTGCTGACT	CAGAAATACA	CTCAACTGCT	CTCTTCTGCC	AGCCCTCCCT	CCCCATACAT	540
CCCTCTTCT	TGGATTGGGC	TGCTGCAACC	ATAAGGGAAA	CAAATCCCTT	AGCCAGTAAA	600
GCAATTCTCT	TCAAATTCTG	AGAGGCTAC	CTTCGGTGGC	TCCCCTCCCT	CCCCCTGCA	660
GCCTCAACAA	ACTCGGGCAG	GTGCCAGGGC	CAGAGAACTG	GGGCCAGGGG	GTCTGAAGC	720
CAGGCCACCT	AGAAAGGACA	GGGACAGTCA	GGCCAGGACA	GTTATAGGTG	GCAGGGTCAT	780
GCAGTCCGAC	CACCCACCGAG	GGGCAGAGCC	AACGGACAGA	GGCCAGGCT	AAGCCACCCA	840
GGGAGATGGG	GCTATTTITA	ACTCAGCTTA	ATTTTCCCTA	CCTGGAAACT	AACTCTTGTC	900
AGTGGAGCG	CGCTGTTCCG	GGATGGCTT	CATCCCCTAA	GATCTGCT	CGCTTAGGTT	960
CCTGGGCCAG	TCCCTCTCCAT	TTCACAGGAG	CCCTGCTTGT	TCAGCTCAGG	CACAGGGCAG	1020
AGAAGGAGAC	AAACCGGAGC	CCGGCCCAAGC	TCGCAGCTGG	CTGTGCTGAC	CCTGCGGGGC	1080
TCGGGCAGCA	CCCCCTGCCT	TGTAGTCACC	CTTCTTCACT	ACCCGGGAGG	GATCCTGTC	1140
CTGGGTTCAT	TTAATGCTTC	TATTATGTTT	CCCCGGCTCG	GAGCCTCTGG	TTCCCTATTG	1200
TCTTGAGCG	GCGTTTGCA	TTTGTCTAAA	GATTAGACGC	TTTATAACCT	TCCCCTCTCT	1260
CCCTATGGTT	TCCCTCTTTT	ACTTTCTCAA	ATCTGAGTTC	TTTCTTCTG	GCTACGGACT	1320
GCTTCCTCAT	TCTCCCCCTC	TCTCCCTGCC	TGTCTTATC	TGCTCCCTG	TTTGTGTTCC	1380
TCCCCACCAT	GACCCCTCC	GTCTCCCCGC	TGACCTGCTT	TTCCCTCTTT	CTTCTCTTC	1440

同じく、プロモーター活性を増減させる物質の検索にも利用することができる。更に、ここに製造されるヒト・エンドセリン-2遺伝子のプロモーターを含有するベクターを用いて、生体におけるヒト・エンドセリン-2の発現機構の解析や、ヒト・エンドセリン-2遺伝子のプロモーターの制御物質の解明が可能となる。

【0038】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：3367

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

ハイポセティカル配列：No

起源：

生物名：Homo sapiens

細胞の種類：白血球

配列の特徴

特徴を表す記号：promoter

存在位置：3323..3367

特徴を決定した方法：E

特徴を表す記号：TATA signal

存在位置：3338..3344

特徴を決定した方法：S

CGCTCCAGCG ATTTGAATTCTCTATCCACC CCCAAGCAGC CCCCAGCCCT GCTTAATTCC	1500
GTATTATAT TCTTCGAGAG GCTGATAGAA ATGACTGTGA GTATTGCTCA CCTCATTC	1560
CAAATACTCT TCTAAATTCT TCGAGAGGCA CGACCTGGGA GGGCAGAGAG CACCTCACGG	1620
GGAGTCCCTT GTGCTTTGCT TGATAGACCA AGCCACCTGC CCGCTGGTC GCCTTGACCA	1680
GGCCCTGCTC CTCTCTGAGC CTCGTGGCA GTCCTGAGCT GACTCCCCCTG TGATAATAGC	1740
TGCCCTCTGG GGTGTTGGTC AGGAAGAGTC GATAGTGCTC CAAGCACGTA GTAGTGCTC	1800
AGGAAACATT TGTGTTGTTT TTTCACAGGA GCCAGCTCAG TCTCCAGGAA GGAAGATCCT	1860
GCTCTCACCC TCCATCAGCT CTGCCAGTTT CTCCAGGATT TCACACATGC ACGCTTGCTC	1920
TGGGCACACC CTAGGAAGAT GCAAACATTGC CTGTTCTGG TGTCACCTA CTGTCCTT	1980
CATAAATGTC CAAGGACAAA GGACCTGCTG AATACAGGAA CTGAGCATG GGCATCTGG	2040
GTTCTGTAAG TCGAAAGCCA GGTGTCATC TCTTGACCCC CCTGCCCTCA GGAACCACTC	2100
GCAAGGCCCT TACTGTGTGC AGGGTAGGTG TCAGGCCCTG CCTCCCTGG GGCTCTGGAC	2160
CTTGAGATTG CACGGGAGAT AACTGCAATC GGATGAGTCA GGCAGGCACG AGAGGCACAG	2220
CCCCTGGAA TTCCAAGAAA CGACAGGGCC TTTCTGTTG TGCCCTGGAGA CAGGGTCCCT	2280
GAGAAGACTC CACCGAGGAAG TGGACTCTCA GCCAGGGCAG GAACAGAGGG TGCCCTCCAG	2340
TTCCCTGAGC TGCTCAGCAC AGCTGTGGTT CATCCCTGCT TTCCCTCCCC CGCAAGGCT	2400
TCTGGGCCAG CAGAGGGCAGA GGAGCACAAT GCCAGTCCCC AGAGAACTCC CCTGGCTTAC	2460
TTCTTTGCA GACACTAGGCC CCCGGTGGAA GCCAAGACAT CCTCTCATGG CCAGGACAGG	2520
AGACTGTTCA AGGGGCCCTT TGTGTGTG TGCTCAGGGA CATCTTCTG GAAAGGGTC	2580
TGAACCCACC TTCTTAGCT CAAAGGAGCC TGTAAAGCCAA GCAGGTGAAC TACCTTCTG	2640
TTTGGCCCTT GTTGCAAAC AAGGAAACAG GCCCAGGAAG GATGCCCTTG GCCATGGCTG	2700
CATACCTGAA CAGCTCTGG AAGGGACTAG AACTCCTGCC CCAGGCCCTG GGTCACAGG	2760
GCAGGGGTTG AGGGGGCAT TTCTGGGTG AGCTGGGAT GAAGCACTTC CAGGCTTGTC	2820
AGAACTCAGG CATGAGCTGTG TCTCTTCACA GAGGGAGGCA GGGCCAGAGA GGGCTCTGAC	2880
TCCGCCAAGG CCACACAGCC TTGCGTGGCC CTTTCACATC CCACACAACA GAGGGGCATC	2940
CTCAGCTGG TTGGCAGAGG GCAGGCAGGA TAGATGGCAG AGTCTTCTCC GAGGAGAGG	3000
GTTCCTCTCA TCGAACCTCC TCCTCCACAC TCACAGCCCT GGGCGAGACC TGTGAGGCAG	3060
CCGCCAACAG AGTGAGGGAG GGGGCTCGGG GCACCTGGGG GTGACTTGAG GAACTCCAGC	3120
TGGACTGCGA GGGGCCCCCTG GGGACTGCCA GGGAGCCTCA GGACTCCAG AGGTCTCCA	3180
GGCACAGAGG GAGGAATGGG CCTTCCATCT CCCTCCCCCCC TTCACTGAG AGGCTGGTC	3240
GGCCCGAGGTG CCCGGGGAGG AGCGGGTCTC CCTGGCTCCC AGCCCCCGG TGCAAGGGG	3300
CAGGGCTGGA CCAGAACGGG TGGGGCACCG TGCCCTGGTAT AACAGGCACG CAGGGCACCG	3360
AGGGCAAT	3367

配列番号：2

配列の長さ：1173

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

ハイポセティカル配列：No

起源：

生物名：Homo sapiens

細胞の種類：白血球

配列の特徴

特徴を表す記号：promoter

存在位置：1129..1173

特徴を決定した方法：E

特徴を表す記号：TATA signal

存在位置：1144..1150

特徴を決定した方法：S

配列：

GACTCAGGCCA GCCACAGGAGC GCACAGGCCCT GGGAAATTCC AAGAAACAG AGGGCCTTTC	60
CTGTTGTGCC TGAGACAGG GTCCTGAGA AGACTCCACG AGGAAGTGGA CTCTCAGCCA	120
GGGCAGGAAC AGAGGGTCCC TCCCAGTTCC CTGAGCTGCT CACCAAGCT GTGTTCATC	180
CCTGCTTCC CCTCCCCGGC AAGGCTTCTG GGCAGCAGA GGGCAGGAG CAGAATGCCA	240
GTCCCCAGAG AACTCCCTG CTTTACTTCT TTTGCAAGACA GTAGCCCCCG GTGGAAGCCA	300
AGACATCCTG TCATGGCAC GACAGGAGAC TGTCAAGGG GCGCTTGTG TGTTGTCT	360
CAGGGACATC TTCTGGAAA CGGGCTCTAA GCCACCTCT TAGTCTCAA CGAGCCTGTA	420

AGCCAAGCAG GTCAAGTACC TTCTTGTGTTT GGCCCTTGTGTTT GCAAACAAGG AAACAGGCC	480
AGGAAGGATG CCCTTGGCCA TGGCTGCATA GCTGAACAGC TTCTGGAAGG GACTACAAC	540
CCTCCCCCAG GCCTCTGGGT GACAGGGCAG GGCTTGAGGG GGGCATTTCC TGGGTGAGGT	600
GGGGATGAAG CAGTTCAGG CTTGTCAGAA GTCAGGCATG AGCTGTGTCC TTCACAGAGG	660
GAGGCAGGCC CAGAGAGGGC TCTGACTCGC CCAAGGCCAC ACAGGCCAC GTGGGCCTT	720
CACATCCCAC ACAACAGAGG GGCATCCTCA GCCTGGTTGC CAGAGGCCAG CCAGGATAGA	780
TGGCAGAGTC TTCTCCGAGG AGAGGGTTT TGCTCATGGA ACCTCCCTCC ACACACTCAC	840
AGCCCTGGGC GAGACCTGTC GAGCAGCCGC CAACAGACTG AGGGAGGGGG CTCGGGGCAG	900
CTGGGGGTGA CTTGAGGAAG TCCAGCTGGA CTGCGAGGGG CCCCTGGGGA CTGCCAGGGA	960
GCCTCAGGAC TCCCAAGGGT GCTCCAGGCA CAGAGGGAGG AATGGGCCTT CCATCTCCCT	1020
CCCCCCTTCA CTGCAGAGGC TGGGTGGGC CAGGTGGCC CGGAGGAGGC GGTGTCCCTG	1080
GCTCCCAGCC CGCCGGTGCA CGGGGGCAGG GCTGGACCAAG AAGGGGTGGG GCACCCGTGCC	1140
TGGTATAAGA GGCAAGCCAGG GCACCCAGGC AAT	1173

配列番号：3

細胞の種類：白血球

配列の長さ：45

配列の特徴

配列の型：核酸

特徴を表す記号：promoter

鎖の数：二本鎖

存在位置：1..45

トポロジー：直鎖状

特徴を決定した方法：E

配列の種類：Genomic DNA

特徴を表す記号：TATA signal

ハイポセティカル配列：No

存在位置：16..22

起源：

特徴を決定した方法：S

生物名：Homo sapiens

配列：

GGCCACCGTG CCTGGTATAA GAGGCAGCCA GGGCACCGAG GCAAT 45

配列番号：4

トポロジー：直鎖状

配列の長さ：45

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の型：核酸

ハイポセティカル配列：No

鎖の数：二本鎖

配列：

AAACAGTGTG TCTACTTCTG CCACCTGGAC ATCATCTGGC TCAAC 45

【図面の簡単な説明】

【図1】ヒト・エンドセリン-2の前駆体の一部をコードするDNAを含むゲノムDNAの制限酵素地図である。

【図2】ヒト・エンドセリン-2遺伝子の5'上流域の塩基配列を示す図である。

【図3】ヒト・エンドセリン-2遺伝子の5'上流域の塩基配列を示す図である。

【図4】ヒト・エンドセリン-2遺伝子の5'上流域の塩基配列を示す図である。

【図5】図2の塩基配列の一部で、TATAAAボックスなどの転写シグナルの位置を示す図である。

【図6】図2の塩基配列の一部で、TATAAAボックスなどの転写シグナルの位置を示す図である。

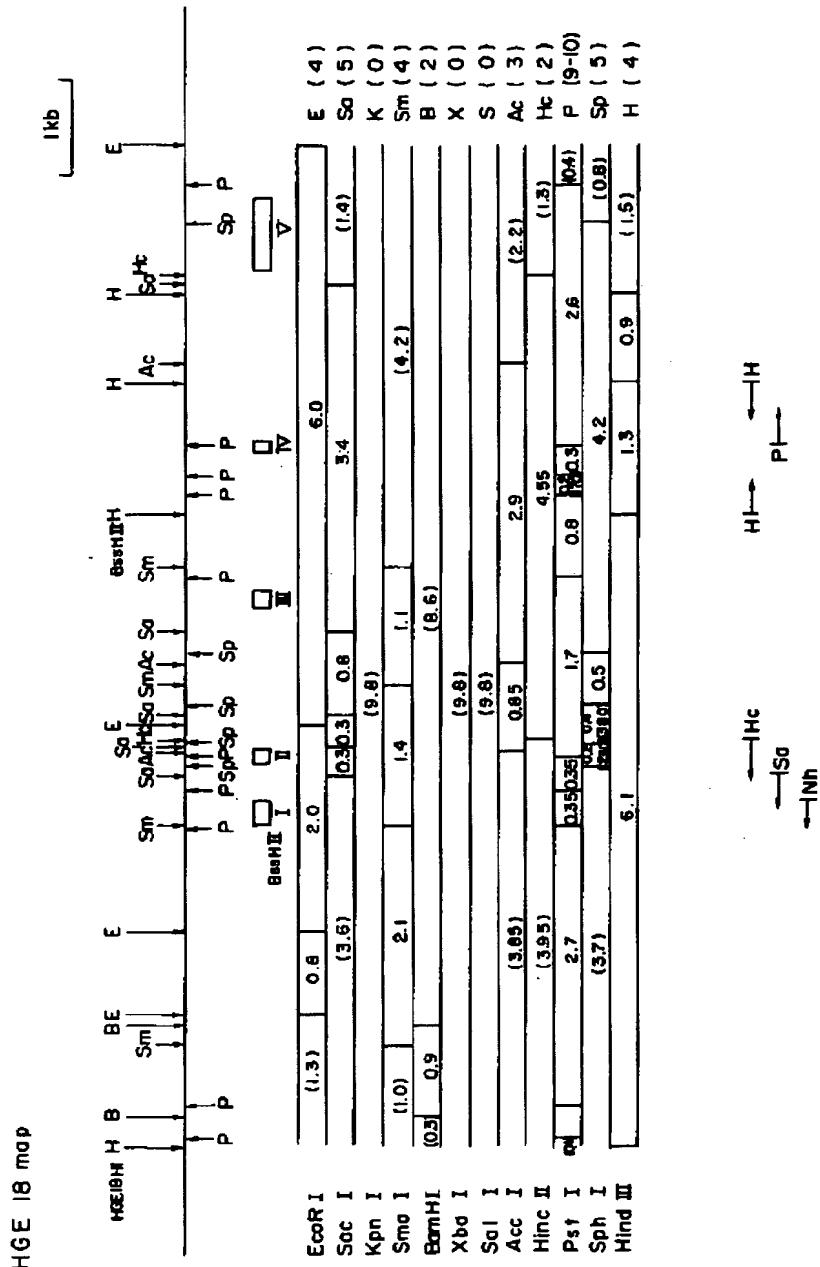
【図7】ヒト・エンドセリン-2遺伝子のプロモーターを含むDNA断片及び該DNA断片の下流に接続されたCAT遺伝子を含有するプラスミドである、プラスミドA、プラスミドD、プラスミドEの構成を示す図である。

【図8】プラスミドA、プラスミドD、プラスミドEで形質転換されたヒト腎臓細胞のCATアッセイのオートラジオグラムを示す。

【図9】発現ベクターに含有されるヒト・エンドセリン-2のプロモーターを含む種々のDNA断片とその下流に結合されたルシフェラーゼ遺伝子とを示す図である。

【図10】図9に示されるDNA断片を含有するプラスミドでACNH細胞を形質転換した後、発現されるルシフェラーゼの活性を示す。

【図1】



【図2】

AAGCTTCTGGTCCAGGGCTCGATTCCAATCTCCAGGACCTGCTGCAGCCAGGCTCTG
 TGTGTCAGGCACTACTAGGAGACTTGTCTCACTCCTGCAACCTGCACTTCACTAGCTAG
 TGTGTCACACCTGCTGACAGCTGCTTGAGCGGAGCACTATTGGCTTACAGCTGGGACTA
 TAGAGGGACCTTGGGCTGACAGAGAGCACGCTTACCTCATCCAACTGGGAGCTT
 CCTGCGAGTGGGGCTCTTCTTGAGGCCCTTCCTGAGCGGACCCAGGATCTGGGCTCAG
 TTGGGACCCCTGGGAGAGCTTCAGGGTGTACAGCAAAAGGGTCAAGGGCTTGGGAGGCA
 AGAGAGACACCCAGGCGGATCACTGCTCTGAGCGAGTGTCTCTGCTTCACTGAG
 TTATCTCATCTACAAAATGGGAGTGGAGAGGGGATTTCTAGGGGGAGCTTCTGAGGCA
 GTGCTGACTCAGAAATACAGCTCACTGCTCTGAGGCCGCTCTCCCTACATACAT
 CCTCTCTCTGGATGCGCTGCTGAGGATAAGGGAAACAAATGGCTTGGGAGTAA
 GCAATTCTCTCACTTCTGAGGGTGTACCTTCTGGGCTCTGCGCTCTGCGCTCTGCA
 GCGTCAGAACAACTCTGGCAGGTCAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG
 CAGGCGACCTAACAAAGCACGCCAGCTGAGGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG
 GCACTGCGACCCAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG
 GGGAGATGGCGCTTATTTTACTCATCTATTTTCTCTACTCTGAGGAAACTACTCTGTC
 AGTGGGACCGCGCTTCTGGGAGTGGCTTCACTCCCTAGATCTGCTGCTGCTTGGGTT
 OCTGGGCGAGCTCTGCTCTGAGGAGGAGCTGCTGCTGCTGCTGAGGAGGAGGAG
 AGAAGAGGAAACCGRGAGGCGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG
 TGGGGCGACCGCGCTTCTGGGAGTGGCTCTGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG
 CTGGGTTCTATGCTCTATGCTGGGCGCTGCTGGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG
 TCTTGAGGCGCTTCTGGCTCTGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG
 CCTATGGGTTCTCTCTCTCTACTCTCTCTGCTCTGCTCTGCTCTGCTCTGCT
 CCTCTCTGCT
 TCCCACCCATGACCCCTCTGCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
 CGGTCAGGCGATTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
 GTATTCATCTCTGAGGGCTGAGGAGTGGCTTAAAGTACTGCTGACTTCTGAGGCT
 GAAATCTCTCTCTAAATCTGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
 60
 120
 180
 240
 300
 360
 420
 480
 540
 600
 660
 720
 780
 840
 900
 960
 1020
 1080
 1140
 1200
 1260
 1320
 1380
 1440
 1500
 1560
 1620

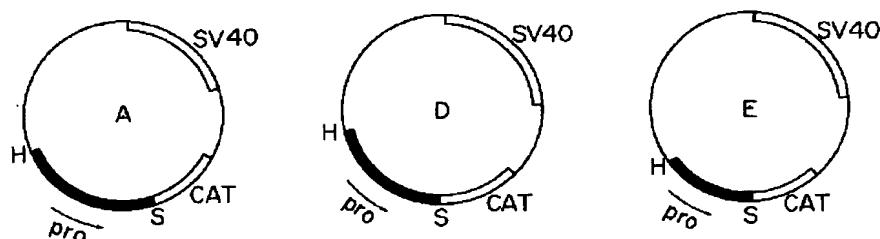
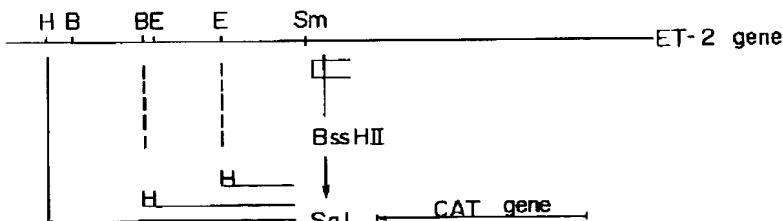
【図3】

GGAGCTCTTGTGCTTCTGATGAGACAAACGACTGCGCGCTGGGCTGGCTTGACCA 1680
 GGGCGCTCTCTCTCTGAGGCTGCTGGGCACTGCTGACTGACTGACTGATAATAAGC 1740
 TGCGCTCTGGGGTGTGGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 1800
 AGGAAACATTTGTTGTTGTTTCTACAGGAGCCTGAGCTAGCTGAGGAAAGAGATCT 1860
 GCTCTCACCTCTACATGCTGCGCTGCTGAGGATTCACACATGAGACCCCTGCTC 1920
 TGGGCACACCTGAGGAGATGCAAACTGCGCTGCTGCTGAGCTACTGCTGCGCT 1980
 CATAATGTCGCAAGGACAAAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 2040
 GTTCTGAGTGGAAAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 2100
 GCAAGGCGCTACTGCTGCGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 2160
 CTGAGATTGCAAGGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 2220
 GCGCTGGGAATTGCAAGGAAAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 2280
 GAGAAGACTCAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 2340
 TCGCTGAGCTCTGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 2400
 TCTGGGCGACCCAGAGGGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 2460
 TCTCTCTGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 2520
 AGACTCTCAAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 2580
 TGAGCCACCTCTTCTGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 2640
 TTTGGGCTTGTGTTCAACAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 2700
 CATACTGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 2760
 GCAGGGGTCAAGGGGGGAGTTCCTGGTGAAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 2820
 AGAGTCTAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 2880
 TCCCGCAAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 2940
 CTCACTGCTGGTGGCTGAGGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 3000
 GTTCTGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 3060
 CGGCAACAGACTGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 3120
 TGGACTGGAGGGGGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 3180
 GCGACAGGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 3240

【図4】

GGGCCAGGTGCGCCGGGGAGGAGGGGGCTGTCGCTGGCTCCAGGCCCGGGGCTGCAAGGGGG 3300
 CAGGGCTGAGGCAAGAGGGGCTGGGGCACCGTGCTGCTGTTAAAGAGGCAAGGGAGGAGGAG 3360
 AGGCAATGAGCTATCTGCTGAGGCTTAATAGCAGGAGGCTGGCAACGGCGCTCGCTC 3420
 CAGTCGAGGCTGGGG 3436

【図7】



[図5]

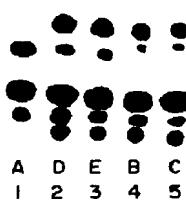
5' ACTCTCTTAATTCCTGGAGCCACGACGCTGGGAGGGAGAGACACCTCAAGGGGACT
 OCCTTGTGCTTTGCTTGTAGACCAAGCCACCTGCCGCTGGGTGGCCCTGACCAAGGGC
 (BRE)
 TGCTCTCTCTGAGCTCTGGCAGCTCTGAGCTGACTCTCTGTSATAATAGCTGCT
 (AP-1)
 OCTGGGGTGTGGTGAGGAAGAGTCGATAGTCCTCCAGCAAGCTAGTAGGTGCTCAGGAA
 ACATTGTTCTTTTCACAGGAGCCAGCTCAGTCCTCAGGAAGGAAGATCTCTGCT
 (GRE)
 CACCTCCATCAGTCTGCCAGTTCTCAGGATTTCACACATGCACTTCTGCTCAGGCT
 ACACCTAGGAAGATGCAACTTCCCTGTCCTGGTGTACCTACTGTCCTCTCATAA
 (OTF1)
 ATGTCCTAACAGGACAACAGGACTGCTGAATACAGGAACCTGACCAATTGGCATCTGGTTCT
 (GRE)
 GTAACTGGAAAGCAGGTGTCACTCTCTGACCCCTCTGGCTCAGGAAGCACTGCAAG
 (CREB)
 GCGCTACTGTGTCAGGGTAGGTGTCAGGCTGCGCTCTGGCTCTGGACCTTGA
 GATTGCAAGGGCAGATAAGTGCATGGCTGAGCTCAAGGCAACAGGGCACAGGGCT
 Jun/AP-1
 GCGAATTCTAACGAAACCGAGGGCTTCTGTTGTCAGGAGACAGGGTCCCTGAGAA
 GACTCCACAGGAAGTCGACTCTCACCCAGGGCAGGACAGAGGCTGCTCCAGTCC
 (GRE)
 TGAGCTGCTCAGCACAGCTGTTGCTCCCTGCTTCCCTCCGGCAAGGCTCTG
 GCGAGGAGGGGAGGAGCAATGCGAGTCCAGAGAAGTCCCTGGCTTACTCTT
 TTGAGACAGTACCCCGGGTGGAGCCAAGACATCTGTCATGGCCAGGACAGGAGACT
 (TRE)

[図 6]

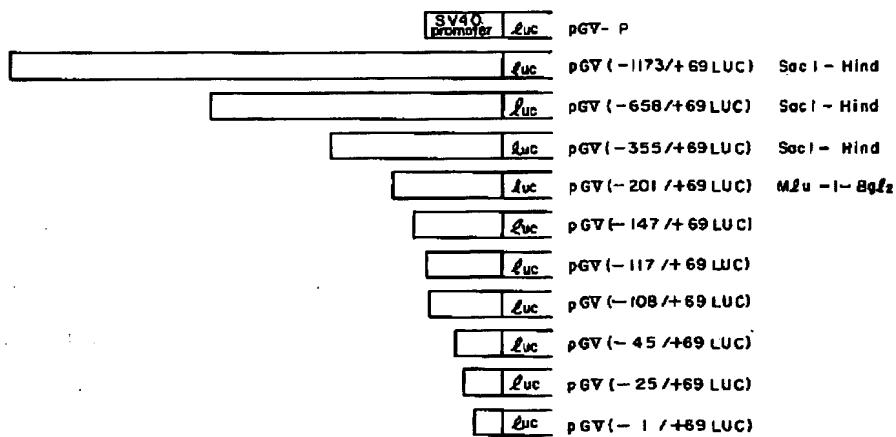
60	GTTCAGGGGCCCTTGTGTTGTCAGGACATCTTCTGGAAACGGCTCTGAC (CREB)	(CREB)	1020
120	CCACCTTCTTACTCTCAAGGAGGCTGTAAGCCAAGCAGGTGAAGTACCTCTTGTGTTG (GRE)		1080
180	GCCTTGTGCAAAACAGGAAACAGGOCAGGAAGGTGCGCTTGGCCAAGGCTGCAATAG (OTF1)		1140
240	CTGAACAGCTCTGGAAGGGACTAGAACTCTGCCAGGGCTTGGGTGACAGGGCAGG 		1200
300	GGTTCACGGGCCATTCTGGCTGAGGTGGGATGAAAGCAGTTCCAGGCTTTCAGAAC (CREB)		1260
360	TCAGGCATGAGCTGTGCTCTCACAGAGGGAGGCAGGCCAGACAGGGCTCTGACTGCGC (AP-1)		1320
420	CAAGGCCACACACCTTGGCTGGGCCCTTCACATCCCACACACAGGGGCTCTCGA (ERE)		1380
480	CCTGGTTGGCAGAGGGCAGGGCAGGATAGATGGCAGAGTCTCTCCAGGAGGGTTT 		1440
540	GCTCATGGAACCTCTCTCCACACTCACAGGCCCTGGGGAGAGCTGTGGAGCAGGGCC 		1500
600	AAACAGACTGAGGGAGGGGGCTGGGGCAGCTGGGGTGACTTCAAGGAAGTCCAGCTGGAC (CREB)		1560
660	TGGGAGGGGCCCCCTGGGACTGCGAGGGAGCTCAGGACTCCAGAGGTGCTCCAGGCAC 		1620
720	AGAGGGAGGAATGGGCCCTTCATCTCCTCTCCCCCTTCACTTGAGAGGCTGGCTGGCTCGGG 		1680
780	ACGGTCCCCGGAGGAGGGCTGGTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGG (MLTF/USF)		1740
840	CTGGACCAAGGGGTGGGCCACGGTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGG (ERE) TATAbox		1800
900	ATGAGCTATCTGCTCACTTAATACCGAGGCGCTGGCAACAGGGCTCCCTGCTCCAGTC 		1860
960	CAGCCTGGCGCG3'		1871

〔图8〕

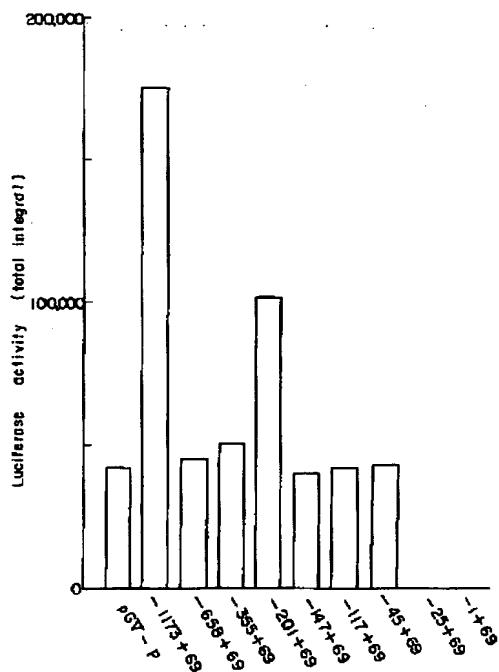
CAT - assay
ACBN - ET 2
autoradiography 3 days



【図9】



【図10】



フロントページの続き

(51) Int.C1. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/70				
15/85				
C 1 2 P 21/02	C	8214-4B		
// A 6 1 K 37/02	ABT	8314-4C		
C 0 7 K 13/00		8517-4H		
(C 1 2 N 1/21				

C 1 2 R 1:19)
(C 1 2 N 5/10
C 1 2 R 1:91)
(C 1 2 P 21/02
C 1 2 R 1:19)
(C 1 2 P 21/02
C 1 2 R 1:91)

Concise Explanation of Japanese Reference

Published Unexamined Patent Application No. Hei 06-165679

Title: DNA comprising a region having promoter activity of human endothelin-2

This invention relates to DNA containing DNA encoding a region having promoter activity of a vasopressor peptide, human endothelin-2; a vector containing said DNA; a transformant harboring said vector; and a method for having a structural gene expressed, wherein the gene encodes a protein or peptide and is linked downstream of the DNA having the promoter activity. Herein, by "promoter" is meant a DNA region to which RNA polymerase binds to signal initiation of RNA transcription.

The procedure for isolation of the promoter region is as follows: 1) human leukocyte genomic library was screened using labeled 5'-sequence of human endothelin-2 cDNA as probe; 2) a genomic clone was obtained, and physical map was prepared for this genomic region; 3) the promoter region, ca. 1 kb in length, was specified by CAT assay and sequencing; and 4) the promoter activity of this region was defined to more restricted region by luciferase assay using truncation mutants of this region.